

E19650899

Patent number: DE19650899
Publication date: 1998-06-18
Inventor: BRINK GUNNAR DR (DE); GROLL HENNING DR (DE); STEINLE WOLFGANG (DE)
Applicant: BRINK GUNNAR DR (DE)
Classification:
- **international:** G01N21/39; G01N21/55; G01N21/31; G01N21/55; (IPC1-7): G01N21/63
- **european:** G01N21/39; G01N21/55B2
Application number: DE19961050899 19961207
Priority number(s): DE19961050899 19961207

Also published as: WO9825130 (A1)[Report a data error here](#)**Abstract of DE19650899**

The invention relates to biological and chemical sensing devices using variable frequency laser diodes. One specific embodiment of the invention disclosed is a biological affinity sensor operating on the basis of surface plasmon resonance. The exciting light used in the sensor originates from a diode laser whose wavelength is modulated by a modification of the laser current, a temperature change or by movement of a short-extended cavity. A wavelength measuring device is built into the optical apparatus, measuring the resonance shifting regardless of mode jumping, variations in polarization and intensity. The entire optical path, specially a prism, a polarizer and lenses, the transducer volume and the above-mentioned wavelength measuring device are kept at a constant temperature.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 196 50 899 A 1**

(51) Int. Cl. 6:
G 01 N 21/63

(21) Aktenzeichen: 196 50 899.1
(22) Anmeldestag: 7. 12. 96
(43) Offenlegungstag: 18. 6. 98

DE 196 50 899 A 1

(71) **Anmelder:**
Brink, Gunnar, Dr., 80801 München, DE

(74) **Vertreter:**
Vossius & Partner GbR, 81675 München

(72) **Erfinder:**
Brink, Gunnar, Dr., 80801 München, DE; Groll, Henning, Dr., 57439 Attendorn, DE; Steinle, Wolfgang, 80809 München, DE

(56) **Entgegenhaltungen:**
DE 41 24 920 C2
DE 1 96 07 167 A1
DE 41 10 095 A1
DE 39 03 296 A1
US 52 55 075 A
tm-Technisches Messen, 62, 1995, S. 204-212;
Applied Optics, 29, 1990, S. 1327-1332;
Applied Optics, 33, 1994, S. 7059-7066;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) **Optische Sensoren unter der Verwendung durchstimmbarer Laserdioden**

(55) Die Erfindung betrifft Vorrichtungen zur Bio- und Chemosensorik unter Verwendung durchstimmbarer Laserdioden. Insbesondere wird die konkrete Ausführung eines Bio-Affinitätssensors gezeigt, der auf der Grundlage von Oberflächenplasmonenresonanz arbeitet. Das im Sensor verwendete Anregungslicht stammt aus einem Diodenlaser, dessen Wellenlänge durch eine Veränderung des Laserstromes, durch Temperaturveränderung oder durch Bewegung einer Short-Extended-Cavity moduliert wird. Ein Wellenlängenmeßgerät ist in der optischen Apparatur integriert, das die Resonanzverschiebung unabhängig von Modensprüngen, Intensitäts- und Polarisationsschwankungen messen kann. Der gesamte optische Strahlengang, insbesondere ein Prisma, ein Polarisator und Linsen, das Transducervolumen sowie das oben genannte Wellenlängenmeßgerät werden thermisch konstant gehalten.

DE 196 50 899 A 1

Beschreibung

Halbleiter-Diodenlaser sind wegen ihrer geringen Kosten, ihrer Kompaktheit, ihrer hohen Lebensdauer, ihrer Robustheit, ihrer Durchstimmbarkeit, ihrer hohen spektralen Leistungsdichte und ihres geringen Rauschens einzigartige Lichtquellen für viele spektroskopische Anwendungen. Als spektroskopische Lichtquellen werden sie in Zukunft insbesondere die analytische Chemie, die Chemosensorik und die Biosensorik revolutionieren. Besonders interessant für diese Anwendungen sind Diodenlaser, die bei Raumtemperatur betrieben werden können, da der zu ihrem Betrieb notwendige apparative Aufwand sehr gering ist. Dies bedeutet zur Zeit eine Einschränkung des zugänglichen Wellenlängenbereiches für Diodenlasersensoren auf das Spektrum zwischen ca. 0,6 µm–2 µm, wenn nicht zusätzliche nicht-lineare optische Prozesse zur Frequenzkonvertierung des Laserdiodenlichtes verwendet werden. Dieser Wellenlängenbereich wird von III/V-Halbleiterverbindungslaserdioden auf der Basis der Materialien AlGaAs, InP, und InGaAs abgedeckt. Laserdioden dieser Typen sind kommerziell erhältlich. Insbesondere wenn für die Spektroskopie Laserdioden, die als Massenprodukt für andere Anwendungen – z. B. Telekommunikation, CD-Lesegeräte, Laserdrucker, Barcode-Scanner, Lichtschranken, in Zukunft Laser-Fernsehen – hergestellt werden, Verwendung finden, sind diese preiswert und breit verfügbar. Andere Laserdioden auf der Basis von Bleisalzen (PbSe, PbTe) arbeiten im infraroten Spektrum (ca. 3 µm–30 µm). Sie werden in der Regel bei kryogenen Temperaturen betrieben. Dies macht ihren Einsatz insbesondere in Sensoren schwierig, wenn nicht unmöglich. Eine Beschreibung der Nutzung durchstimmbarer Laserdioden für die analytische Spektroskopie findet sich in Henning Groll, Doktorarbeit (Universität Hohenheim 1995).

Bei den für die Spektroskopie benutzen Lasern handelt es sich in der Regel um transversal und longitudinal einmodige Dauerstrichlaser, deren Emissionswellenlänge sich mit Hilfe des Injektionsstroms und der Temperatur des Diodenlasers durchstimmen lässt. Die Wellenlänge eines Lasers lässt sich in einem Bereich von ca. 15 nm–20 nm verstimmen, wenn seine Temperatur zwischen ca. -20°C und +60°C variiert wird. Temperaturänderung dieser Größenordnung sind mit einfachen Peltierkühlern leicht zu realisieren. Kommerzielle Laserdioden sind für diese Betriebstemperaturen spezifiziert. Der Durchstimmkoeffizient beträgt ca. 0,25 nm/K. Werden Fabry-Perot-Laser verwendet, so erfolgt die Wellenlängendurchstimmung nicht kontinuierlich über den gesamten Variationsbereich. Vielmehr werden je nach Temperatur und/oder Laserstrom verschiedene longitudinale Moden des Laserresonators mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Dabei treten Hystereseeffekte auf. Die Durchstimmbarkeit innerhalb einer Mode beträgt bis zu ca. 1 nm und hängt stark vom verwendeten Diodenlaser ab. Die Durchstimmung mit Hilfe der Lasertemperatur ist naturgemäß ein langsamer Prozeß. Raten von ca. 0,5 K/s für reproduzierbare Messungen sind möglich. Wird dagegen der Injektionsstrom zur Durchstimmung verwendet, lassen sich Durchstimmfrequenzen im kHz Bereich leicht realisieren. Eine Frequenzmodulation mit Frequenzen im Bereich der Emissionslinienbreite einer freilaufenden Laserdiode (ca. 10–100 MHz) oder mehr ist möglich. Eine schnelle sprunghafte Wellenlängenänderung gestatten short-extended-cavity-Laser, die aus einer Laserdiode und einem weiteren äußeren, dicht vor der Laserdiode platzierten Rückkoppelspiegel bestehen, dessen Abstand mit Hilfe eines Piezoaktuators schnell geändert werden kann. Hier können typischer Weise 5–8 verschiedene longitudinale Moden des gekoppelten Resonators angewählt werden, die jeweils ca. 150 pm von ein-

ander entfernt sind. Eine kontinuierliche Durchstimmung der Laserwellenlänge über nahezu den gesamten Bereich ihres Verstärkungsprofils ist möglich, wenn Laserdioden mit einer Rückkopplung aus wellenlängendiffusiven Elementen betrieben werden. Beispiele hierfür sind die Rückkopplung mit Hilfe eines Reflexionsgitters oder eines Fabry-Perot-Resonators, DFB-Laser (distributed feedback-Laser) oder DBR-Laser (distributed bragg reflektion-Laser). Bei den beiden letzteren handelt es sich um monolithische Systeme, die kommerziell erhältlich sind. Angewandt werden die beschriebenen durchstimmmbaren Diodenlasersysteme in der Atomabsorptionsspektroskopie, der Fluoreszenzspektroskopie, der Resonanzionisationsspektroskopie und den verschiedenen Verfahren der Molekülspektroskopie. Andere realisierte oder in der Literatur vorgeschlagene Anwendungen und Methoden in denen Diodenlaser als spektroskopische Instrumente Verwendung finden, sind die Erzeugung von Frequenz- und Längenstandards auf der Basis atomspektroskopischer Messungen (Cs-Atomuhr), das Laserkühlen von Atomen, aber auch die Bestimmung von Gradienten in Brechungsindices, die photoakustische Spektroskopie oder die Fourier- und Raman-Spektroskopie. Diodenlaser basierte spektroskopische Detektoren wurden z. B. für die Flüssigkeitschromatographie, die Gaschromatographie oder die Kappilarelektrophorese vorgeschlagen.

Bereits in unserer Patentanmeldung (DE-A 43 15 211) haben wir vorgeschlagen, durchstimmbare Diodenlaser als eine mögliche Quelle in der Oberflächenplasmonenresonanz zu verwenden.

Oberflächenplasmonenresonanz (beschrieben z. B. in Liedberg et al., Sensors and Actuators, 4 299–304 (1983) ist eine Technik, in der Veränderungen im Brechungsindex in einer Schicht in der Nachbarschaft eines an einer Oberfläche reflektierten Lichtstrahles gemessen werden, um die Eigenschaften einer Oberfläche zu charakterisieren und Änderungen an ihr zu beobachten. Diese Änderungen können zum Beispiel durch Adsorption eines Analyten aus einer Probenflüssigkeit an einer Oberfläche hervorgerufen werden. Die Beobachtung von solchen Bindungseffekten, die Bestimmung von Bindungskinetiken und die qualitative Charakterisierung von Bindungsstärken kann als Grundlage für Immunsensoren und die pharmazeutische Wirkstoffsuche, aber auch für andere Sensorkonzepte oder für die Entwicklung von Verfahren der organischen Chemie dienen.

Zur Realisation eines Oberflächenplasmonen-Sensors wird ein Metallfilm auf ein Substrat aufgebracht, das ein dielektrisches Material mit höherem Brechungsindex als die zu vermessende Flüssigkeit ist. Üblicherweise wird hierfür ein Glasprisma verwendet. Fällt nun Licht oberhalb des Winkels für Totalreflexion auf die Grenzfläche zwischen Glasprisma und Metallfilm (Edelmetalle wie Gold und Silber) ein, dann dringt die elektromagnetische Welle einige hundert Nanometer als evanescentes Feld in das System Metall-Probenlösung ein. Geschieht dies unter geeigneten Bedingungen, dann können die freien Elektronen des Edelmetalls Energie vom evanescenten Feld aufnehmen und ein Abfall der Intensität des reflektierten Lichts tritt auf. Alternativ kann der Metallfilm auch als gitterförmiger Film aufgebracht werden, wobei dann auch auf das Prisma verzichtet werden kann (Raether, H., "Surface plasmon on smooth and on rough surfaces and on gratings", Springer Verlag Berlin/Heidelberg).

Neben Bindungsexperimenten können andere Veränderungen der optischen Eigenschaften der Grenzfläche in einem Transducer bestimmt werden. So beeinflusst die Anwesenheit von Wasserstoff und anderen kleinen Molekülen oder Ionen die optischen Eigenschaften der plasmonentragenden Grenzschicht oder anderer an der Grenzschicht vor-

handener Materialien bei anderen optischen Verfahren, so daß es ebenfalls zu einer Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz oder anderer Detektorsignale kommt.

Ein entsprechender Sensor kann mit Hilfe einer Spektroskopie, die auf der Verwendung durchstimmbarer oder Multi-Wellenlängen-Laser beruht, die Änderung der optischen Eigenschaften der Oberfläche vermessen und damit die Anwesenheit eines Analyten registrieren und die vorhandene Analytmenge quantifizieren:

Wie beispielsweise in Pockrand et al., J. Chem. Phys. 77 (12) 6289-6295 (1984) und der Patentschrift WO91/01489 ausgeführt wird, gibt es zwei prinzipielle Arten, Veränderungen in der Oberflächenplasmonenresonanz festzustellen:

a) Entweder eine Veränderung der Reflektivität des eingestrahlten Lichts als eine Funktion des Reflektionswinkels (Impulsübertrag der Photonen)

b) Veränderung in der Reflektivität als eine Funktion der Wellenlänge (Energie der Photonen)

Viele Anmeldungen, auch die Patentanmeldung WO94/13044, schlagen ebenso wie unsere Anmeldung DE-A 43 15 211 die Verwendung durchstimmbarer Halbleiterdiode zur Anregung von Oberflächenplasmonen vor. Es sind jedoch keine konkreten Ausführungen bekannt, wie Oberflächenplasmonen durch durchstimmbare Laserdiode spektroskopiert werden können. Konkrete technische Vorschläge, wie ein Diodenlaser-Oberflächenplasmonenresonanz-Spektrometer auszusehen hat, wurden bisher nicht gegeben. Die Durchstimmung von Laserdioden ist in der Atomabsorptions- oder -fluoreszenzspektroskopie oder der Molekülspektroskopiespektroskopie in Gasenluoreszenzspektroskopie oder der Molekülspektroskopie bereits beschriebener Stand der Technik. Bei der Verwendung von durchstimmbaren Laserdioden in Bio- und Chemosensoren und optischen Sensoren sind einige Besonderheiten zu berücksichtigen, die sich gegenüber der Anwendung in der Atomadsorptionsspektroskopie unterscheiden:

1. Die Linie der Resonanz ist wesentlich breiter als üblich in der AAS, entsprechend ist eine genaue Bestimmung der Wellenlänge bei der Oberflächenplasmonenresonanz nur im Bereich mehrerer Picometer bis Nanometer erforderlich.

2. Die Polarisation des Lichtes in der optischen Apparatur muß insbesondere bei der Verwendung in Oberflächenplasmonenresonanz ohnedies kontrolliert werden, somit ist eine Polarisationsabhängigkeit des Lichtes z. B. bei einer Wellenlängendetektion nicht mehr eine zusätzliche Schwierigkeit.

Die Verwendung durchstimmbarer Laserdioden hat in der Oberflächenplasmonenresonanz im Gegensatz zu der Durchstimmung anderer Lichtquellen oder der gebräuchlichen Veränderung des Reflektionswinkels eine Reihe von Vorteilen. Die räumliche Messung von reflektiertem Licht unter verschiedenen Reflektionswinkeln bedarf einer mechanischen Apparatur zur Bewegung von Lichtquelle oder Detektordiode oder dem Einsatz einer Kamera zur Betrachtung des reflektierten Lichts unter verschiedenen Winkeln. Eine Apparatur unter Verwendung durchstimmbarer Laserdioden kann wesentlich preiswerter, aber auch wesentlich kompakter realisiert werden als die übliche Methode.

Es ist sogar eine Miniaturisierung des Oberflächenplasmonenresonanzapparates denkbar, bei der eine miniaturisierte Sonde an einem langen Lichteitfaserkabel befestigt wird. Die Durchstimmung der Wellenlänge erfolgt in einer separaten Einheit. Derartige Sensoren eignen sich vor allem

zur Anwendung in medizinischen Kathetern, in Sonden, die in große Tiefen oder große Entfernung transportiert werden müssen, beispielsweise zur Vermessung von Tiefseewasser in verschiedenen Meerestiefen, oder beispielsweise in Robotern in Abwasserkanälen.

Bio- und Chemosensoren basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz können auch neue Anwendungen erschließen, falls durch den Einsatz durchstimmbarer Laserdiode eine deutliche Preisreduzierung vorgenommen werden kann.

Anwendungsbeispiele sind:

- das Selfmonitoring von Patienten
- die Prozeßkontrolle in der Biotechnologie
- die Messung der Konzentration von Umweltschadstoffen in Routineanwendungen

Für den im folgenden in seiner konkreten technischen Ausführung dargestellten Sensor sind auch andere Bio- und Chemosensorprinzipien als die Oberflächenplasmonenresonanz denkbar, z. B. andere Meßprinzipien zur Bestimmung der Eigenschaften einer Oberfläche, wie die totale interne Reflexion, die Ellipsometrie oder die Interferometrie und andere in der Literatur, z. B. in Place et al. (1995) (Optoelectronic Immunosensors. Review of Optical Immuno Assay at Continuous Surfaces. Biosensors 1, 321-53) erwähnte entsprechende Verfahren. Weiterhin können auf der Messung von Fluoreszenz gründende Methoden, z. B. Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie, zur Bestimmung von biologischen Molekülen als Sensorprinzip genutzt werden. All diesen Methoden ist gemeinsam, daß zur Detektion und letztlich zur Quantifizierung der zu bestimmenden Spezies, eine spezifische biochemische Reaktion genutzt wird, deren Endprodukt zu einer spektralen Struktur führt, die mit Hilfe von durchstimmbaren Lasern oder Multi-Wellenlängen-Lasern, eindeutig und selektiv vermessen werden kann, und die eine direkte oder indirekte - durch Kalibration oder Eichung des Sensors - Aussage über die Menge des in der untersuchten Probe vorhandenen Analyten ermöglicht.

Der Fachmann wird leicht weitere Sensorkonzepte nennen können, die mit durchstimmbaren Lasern oder Multi-Wellenlängen-Lasern realisierbar sind.

Bei der Verwendung von durchstimmbaren Laserdioden zur Vermessung von Oberflächenplasmonen zeigen sich neuartige Probleme, die z. B. in der Atomabsorptions- oder Fluoreszenzspektroskopie oder der Molekülspektroskopiespektroskopie in Gasen nicht auftreten.

1. Der Hauptunterschied der Spektroskopie an Oberflächen zu denjenigen an freien Atomen oder an Molekülen in Gasen besteht in der wesentlich größeren spektralen Breite der zu untersuchenden Resonanzen. Während atomare Resonanzen oder Linien von Molekülen in gasförmigen, nicht extrem heißen oder unter extrem hohem Druck stehenden Atmosphären einige MHz bis einige GHz breit sein können (im sichtbaren und nah-infraroten Spektralbereich sind das einige fm bis einige pm Wellenlänge) sind typische Oberflächenplasmonenresonanzen in diesem Spektralbereich 10 nm bis 100 nm breit. Atomare Linien können typischerweise innerhalb einer longitudinalen Mode eines Diodenlasers vermessen werden. Dabei ist im wesentlichen die Registrierung der Amplitude der Spektrallinie, weniger ihrer Struktur und Breite von Interesse in analytischen Anwendungen. Die Wellenlänge der Emis-

sion des Diodenlasers muß auf wenige Bruchteile einer atomaren Linienbreite bekannt sein und entsprechend reproduzierbar eingestellt werden können bzw. entsprechend konstant gehalten werden. Die notwendige Durchstimmung der Wellenlänge kann ohne weiteres mit Hilfe des Injektionsstromes ohne Modensprünge erfolgen. Die Anwendung von Techniken wie der Wellenlängenmodulationsspektroskopie oder der Frequenzmodulationsspektroskopie die auf der Modulation der Wellenlänge mit Frequenzen zwischen kHz bis GHz beruhen, zur Bestimmung schon kleinsten Veränderung der Absorption in einem Probenvolumen sind möglich. Ähnliches gilt für die Methoden der Fluoreszenzspektroskopie.

Die sichtbaren und nahinfraroten Dioden können ungefähr 3 bis 4 nm von der nominellen Wellenlänge innerhalb einer 20°-Temperaturänderung durchgestimmt werden. Das Tuning geschieht auf eine sprunghafte Art und Weise, beispielsweise eine glatte Durchstimmbarkeit für etwa 1/4 eines Nanometers, die durch einen Übergang (Modehopping) in der Wellenlänge zu einer anderen Mode gefolgt wird. Durchstimmung mit einer Veränderung des Injektionsstromes (ungefähr 0,01 nm pro mA) zeigt ähnliches Verhalten und in beiden Fällen beobachtet man oft eine Hysterese in den Modensprüngen. Atomare Linien können, wie dem Fachmann bekannt, typischerweise innerhalb einer longitudinalen Mode eines Diodenlasers vermessen werden. Dabei ist im wesentlichen die Registrierung der Amplitude der Spektrallinie weniger ihrer Struktur und Breite von Interesse in analytischen Anwendungen. Die Wellenlänge der Emission des Diodenlasers muß auf wenige Bruchteile einer atomaren Linienbreite bekannt sein und entsprechend reproduzierbar eingestellt werden können bzw. entsprechend konstant gehalten werden. Die notwendige Durchstimmung der Wellenlänge kann ohne weiteres mit Hilfe des Injektionsstromes ohne Modensprünge erfolgen. Die Anwendung von Techniken wie der Wellenlängenmodulationsspektroskopie oder der Frequenzmodulationsspektroskopie, die auf der Modulation der Wellenlänge mit Frequenzen zwischen kHz bis GHz beruhen, zur Bestimmung schon kleinsten Veränderung der Absorption in einem Probenvolumen sind möglich. Ähnliches gilt für die Methoden der Fluoreszenzspektroskopie.

2. Bei Adsorption einer Monolage eines Analyten verschiebt sich die Plasmonenresonanz in der Größenordnung von einigen 100 mGrad beziehungsweise einigen Nanometern. Die Verschiebung ist bei Durchstimmung der Wellenlänge von der verwendeten Basiswellenlänge abhängig. So zeigen Simulationsrechnungen eine notwendige Durchstimmung von der nominalen Wellenlänge von ca. 12 nm bei 1300 nm Basiswellenlänge, falls man von der Adsorption einer 1 nm dicken Schicht auf der Sensoroberfläche ausgeht. Bei der Verwendung einer 780 nm Laserdiode reduziert sich diese notwendige Durchstimmung auf 5 bis 6 nm pro nm adsorbiert Schicht. Bei kleineren Wellenlängen reduziert sich entsprechend die Resonanzverschiebung. Mit Hilfe von durchstimmmbaren Laserdioden kann nun lediglich ein kleiner Teil (20%–50%) der gesamten Resonanz vermessen werden.

3. Aufgrund der Intensitäts-, Frequenz-, Positions- und Polarisationsschwankungen des Laserlichtes aufgrund der Modensprünge sowie der schwierig reproduzierbaren Hysterese bei der Durchstimmung wie auch durch Alterungsprozesse der Laserdiode bringt die Durchstimmung der Laserdiode durch Strom oder

Temperatur bei der Oberflächenplasmoneresonanz Schwierigkeiten.

4. Weitere Schwierigkeiten können temperaturabhängige Schwankungen des Brechungsindex des Substrats, beispielsweise des Glasprismas, und Temperaturschwankungen des Transducervolumens mit sich bringen.

5. Ebenso sind Homogenitätsschwankungen der Beschichtung der Sensoroberfläche auszuschließen und die Orthogonalität der Bindung zu maximieren.

Die vorliegende Erfindung löst diese Probleme durch die in den Ausführungsbeispielen gemachten Vorschläge und zeigt eine preiswerte und exakte Anordnung zur Vermessung von Oberflächenplasmonen mit Hilfe durchstimmbarer Laserdiodenlichtquellen.

Ausführungsbeispiele

20 Im folgenden werden einige Ausführungsbeispiele der Erfindung mit Bezug auf die Zeichnungen erläutert.

Die Vorrichtung besteht, wie in **Zeichnung 1** beschrieben, aus einer Lichtquelle (1), einem Transducer (2) und einem Detektor (3). Vorrichtungen wie Meßküvette, Meßzelle oder Meßkanal (4) und Auswertungselektronik (5), gegebenenfalls computergestützte Auswertung.

25 Die erfindungsgemäße Lichtquelle besteht aus einer durchstimmmbaren Laserdiode (1). Der Transducer (2) ist das Element, wo die biosensorische Reaktion (auch chemische Reaktion in Chemosensoren) stattfindet und eine Interaktion mit dem in der beschriebenen Einheit verwendeten Lichtstrahl (6) erfolgt.

30 Die Transduceroberfläche kann für die Bio- und Chemosensorik beispielsweise mit folgendem Verfahren beschichtet werden: Man beschichtet vorteilhaft die Oberfläche zu-

35 nächst mit Merkaptoothanol oder Merkaptoothanolamin. Anschließend setzt man beispielsweise 1,4-Butandiol-Diglycidylether zu. Anschließend wird daran ein Hydrogel, beispielsweise Dextran oder Polyäthylenglykol gebunden.

40 Anschließend läßt sich dieses Hydrogel mit den bekannten Verfahren der Biochemie mit Rezeptoren oder Liganden versehen. Mit einer solchen Beschichtung können Homogenitätsschwankungen der Sensoroberfläche und Schwierigkeiten mit der Orthogonalität der zu untersuchenden Bin-

45 dung wirkungsvoll reduziert beziehungsweise behoben werden. Eine Beschreibung weiterer Beschichtungsverfahren findet sich in EP 05 89 867 B1 oder in DE 42 19 159. Weitere Beschichtungen beruhen auf der Aufbringung einer dünnen Polystyrol- oder anderen Kunststoffschicht durch

50 Spin-coating oder auf der Aufdampfung oder Aufsputterung eines dünnen Filmes von Glas, Silizium oder anderen Materialien, an welche anschließend dem Fachmann bekannte biochemische Ankoppelungen vorgenommen werden können.

55 Im Detektor (3) wird das vom Transducer ausgesandte Licht aufgefangen und ausgewertet.

Zeichnung 3 zeigt eine Ausgestaltung der Lichtquelle, bei der eine Laserdiode über ein Temperatursteuer- und Regelinstrument (11), beispielsweise ein Peltierelement, in seiner Temperatur beeinflußbar ist. Eine zweite Steuerungsmöglichkeit besteht über den Strom.

Die Einheit enthält vorteilhaft auch eine Kollimationssoptik (8), einen Polfilter (9) sowie eine Irisblende (10).

Zeichnung 4 zeigt eine andere mögliche Ausgestaltung der Lichtquelle. Hier wird die Temperatur der Laserdiode-einheit (7) konstant gehalten (11) und über ein bewegliches Glaspäälchen (16), das in kurzen Abstand (innerhalb der Kohärenzlänge) vor der Laserdiode (15) angebracht wird

und über Stellelemente, beispielsweise nach dem Galvanometerprinzip oder durch piezoelektrische Aktoren, die von einer Konstantspannungsquelle (17) und über einen Frequenzgenerator (18) versorgt werden, beweglich ist, wird eine bewegliche Veränderung der Resonatorlänge (Short Extended Cavity Laser) und so eine Durchstimmung der Wellenlänge ermöglicht.

Zeichnung 5 zeigt die Integration eines Wellenlängenmeßgeräts in den Spektrometeraufbau. Mittels zweier Strahlteiler (22) wird der von der Laserdiode (1) emittierte Lichtstrahl (6) in drei Anteile aufgeteilt, die mit drei Photodetektoren (25) analysiert werden. Der erste Detektor (25a) nimmt das im Transducer (2) erzeugte Oberflächenplasmonenresonanz-Signal auf, der zweite (25b) liefert ein Referenzsignal. Dieses wird genutzt um Intensitäts- bzw. Positions Schwankungen des einfallenden Laserlichts aufzudecken und gegebenenfalls zu beseitigen. Ein dritter Detektor (25c) dient in Kombination mit einem temperaturstabilisiertem Kantenfilter (46) als Wellenlängenmeßgerät. Das Prinzip ist für die Atomabsorptionsspektroskopie bereits beschrieben (Heßling, B., Niemax, K. Spectrochim. acta, 45 B S. 1187, 1990), wird jedoch nicht angewandt, weil die für die Atomabsorptions- oder der Molekülspektroskopiespektroskopie in Gasen oder Fluoreszenzspektroskopie notwendigen Anforderungen nicht erfüllt werden konnten. Bei Verwendung eines Kantenfilters ist zudem Sorge für eine konstante Polarisation des auf den Filter eingestrahlten Lichtes zu tragen. Die Anforderungen nach Kontrolle von Temperatur und Polarisation können in einem Oberflächenplasmonenresonanz-Spektrometer jedoch leicht erfüllt werden, da sowohl die Kontrolle der Polarisation des eingestrahlten Lichtes notwendig ist, als auch die Temperatur des Transducers konstant gehalten werden muß. Beide Parameter beeinflussen auch Gestalt und Position der Oberflächenplasmonenresonanz.

Die Nutzung der in kommerziellen Laserdioden in der Regel vorhandenen Detektordiode als Referenzsignal erweist sich als nicht vorteilhaft, da Polarisations- und Positionsschwankungen des Lichtstrahles von ihr nicht erfaßt werden.

In **Zeichnung 6** wird eine Ausführung mit Lichtleitfaserkabeln dargestellt. Die Lichtquelle (1), unter Nutzung einer durchstimmbaren Laserdiode wie oben beschrieben, strahlt Licht vorzugsweise über einen Faserkoppler in eine Lichtleitfaser (27) oder ein Lichtleitfaserbündel ein und leitet das Licht unter konstantem Einfallswinkel in das Prisma (23) ein. Das an dem Metallfilm (24) reflektierte Licht gelangt durch die Lichtleitfaser (27) in den Detektor (25). Bei Verwendung eines Spiegels (29) kann das vom Transducer reflektierte Licht in die zu leitende Lichtleitfaser zurückgekoppelt werden (**Zeichnung 7**).

Zeichnung 8 zeigt eine mögliche Ausgestaltung des Detektors. Der Lichtstrahl (6) wird von einem Photodetektor (28) erfaßt. Das entstehende Signal wird durch einen Verstärker aufbereitet. In einer Einrichtung zur Datenaufzeichnung (31), beispielsweise ein x-y-Schreiber oder beispielsweise ein PC mit entsprechender Soft- und Hardware, wird das Signal ausgewertet und dargestellt.

Bei der Verwendung durchstimmbarer Laserdioden in Oberflächenplasmonensensoren spielt der dynamische Bereich eine wesentliche Rolle.

Vorzugsweise wird man zur Auswertung von Bindungs experimenten, also bei geringeren Konzentrationen, durchstimmbare Laserdioden anstatt konventionellen Geräten mit Winkel auswertung einsetzen. Es ist auch möglich, die Auswertung mittels durchstimmbaren Laserdioden mit einer Winkel auswertung zu kombinieren, um eine Feinmessung der Beschichtung neben der Grobmessung durchzuführen.

Verwendet man die durchstimmbare Laserdiodenquelle in einer Vorrichtung ohne Winkel auswertung, so wird man aufgrund der begrenzten Durchstimmbarkeit vorzugsweise stärkere Verdünnungen der Meßflüssigkeiten vornehmen als bei Winkel auswertung oder sie bei geringeren Probenkonzentrationen verwenden.

Eine weitere Anwendung durchstimmbarer Laserdioden liegt in der parallelen Ausmessung von Probenflecken in einem bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise der Oberflächenplasmonenmikroskopie (Yeatman und Ash, Electronics Letters 20 968-970 (1987)). Hier strahlt man üblicherweise über ein Glasprisma einen homogenen, monochromatischen, polarisierten, parallelen Lichtstrahl ein, der die Probe, eine Microtiterplatte mit beispielsweise 5000 Feldern in unterschiedlich selektiver Beschichtung, gleichmäßig beleuchtet oder man bewegt einen Lichtstrahl vorzugsweise durch Spiegelgalvanometer parallel über die Meßoberfläche, um so ein bildgebendes Verfahren zu ermöglichen. Setzt man in einer derartigen Vorrichtung als Lichtquelle eine durchstimmbare Laserdiodenquelle ein, so erhält man in der 3. Dimension der Messung die Oberflächenplasmonenresonanzkurve zu jedem Bildpunkt, was eine wesentlich exaktere und weniger störanfällige Auswertung der Meßergebnisse für jeden Bildpunkt ermöglicht.

In allen erwähnten Ausführungen ist das Verwenden von mindestens zwei Meßflecken im Transducer vorteilhaft, um Vergleichsmessungen zu ermöglichen. Denkbar ist auch die Anordnung von Stufen innerhalb des Meßfleckes, wie beschrieben in Sigl et al., Sensors and Actuators, B 24-25 (1995) 756-761.

Man kann den gesamten optischen Aufbau wie in der Optik üblich durch Montage der Bauteile auf einer optischen Bank oder ähnlichen Bauteilen realisieren. Vorzugsweise wird der optische Aufbau aus einem preisgünstigen Kunststoff, beispielsweise Polycarbonat oder Polyolefin-Kunststoff (Topas) bestehen, wobei man alle Einheiten wie Linsen, Blenden, Prisma und Strahlteiler erfundungsgemäß durch Ausnchmungen im Bauteil ausführt. **Zeichnung 9** zeigt einen möglichen Aufbau eines solchen Kunststoff-Preßlings (32). Eine Polarisation des Laserlichtstrahls (6) erfolgt vorzugsweise durch eine zweite oberflächenplasmonenaktive Metallschicht (33) in der Apparatur, an der keine bio- und chemosensorischen Reaktionen stattfinden. An der polarisierenden Metallschicht werden alle Lichtstrahlen mit p-Polarisation im Einstrahlwinkel der Plasmoneresonanz absorbiert (gedämpfte Reflexion) und nur s-polarisiertes Licht weitergestrahlt. Orthogonal zur beschriebenen Polarisatoreninheit setzt man die Oberflächenplasmonenaktive Grenzschicht im Transducer ein, die aufgrund der beschriebenen Polarisation und der Orthogonalität nur p-polarisiertes Licht erhält. Schwierigkeiten mit Polarisationschwankungen sind so wirkungsvoll auszuschließen. In den Preßling sind zugleich ein Strahlteiler (22), beispielsweise ein halbdurchlässiger Spiegel, ein Kantenfilter (34) und ein Spiegel (35), der das polarisierte Laserlicht zur Meßzelle (4) mit dem Transducer umleitet, zu integrieren.

Da die Anforderungen an alle Regelungs-, Steuer- und Detektionselektroniken gut bekannt sind, und im wesentlichen als Digitalelektronik realisiert werden können, ist die Verwendung von benutzerdefinierten integrierten Schaltkreisen (ASIC's) hier von großem Vorteil. Die notwendigen Leistungselektroniken für Stromversorgung der Laserdiode, Temperierung der Laserdiode und Temperierung des Transducervolumens können auch mit herkömmlicher Elektronik realisiert werden. Versionen der Erfindung mit größtmöglichen Eingriffsmöglichkeiten für Laboranwendungen und autarke vollautomatische Systeme für Routineanwendungen können beide mit den vorgestellten Techniken realisiert werden.

den.

Bezugszeichenliste

1 Lichtquelle	
2 Transducer	
3 Detektor	
4 Meßzelle	
5 Auswerteelektronik	
6 Lichtstrahl	10
7 Laserdiodeneinheit	
8 Kollimationsoptik	
9 Filter	
10 Lochblende	
11 Temperatur-Kontrolle	15
12 Temperatur-Modulation	
13 Strom-Kontrolle	
14 Strom-Modulation	
15 Laserdiode ohne kapselndes Gehäuse, auf Wärmesenke und Grundplatte montiert	20
16 bewegliches Glasplättchen ("short extended cavity laser")	
17 Konstantspannungsquelle	
18 Generator zur Modulation der Position des Glasplättchens	25
19 Wärmesenke mit Peltierelement	
20 Lichtmischer ("beamcombiner")	
21 Wellenleiteroptik ("waveguide-chip")	
22 halbdurchlässige Spiegel ("beamsplitter")	
23 Prisma	30
24 Metallfilm mit sensitiver Schicht	
25 Detektor	
26 Polfilter	
27 Lichtleitfaser	
28 Photodetektor	35
29 Verstärker, I/U-Wandler	
30 bandbreitenbegrenzter Verstärker bei Modulationsfrequenz f2	
31 Einrichtung zur Datenaufzeichnung	
32 Kunststoff-Preßling	40
33 Metallschicht	
34 Kantenfilter (33)	
35 Spiegel	

Patentansprüche

45

1. Optischer Bio- oder Chemosensor, **dadurch gekennzeichnet**, daß das im Sensor verwendete Anregungslicht aus einem Diodenlaser stammt, der durch eine Veränderung des Laserstromes, durch Temperaturveränderung oder durch Bewegung einer Short-Extended-Cavity moduliert wird, wobei ein Wellenlängenmeßgerät in die optische Apparatur zu integrieren ist, das die Frequenz unabhängig von Modensprüngen, Intensitäts- und Polarisationsschwankungen messen kann. 55
2. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der optische Strahlengang, insbesondere in einem Prisma, in Linsen sowie im Wellenlängenmeßgerät thermisch konstant gehalten wird. 60
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß als Wellenlängenmeßgerät ein Kantenfilter eingesetzt wird, wobei durch 2 Photodektoren die relative Änderung der Transmission des Filters zur Bestimmung der eingesetzten Lichtwellenlänge verwendet wird. 65
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei der optische Aufbau aus einem preisgünstigen Kunststoff, beispiels-

weise Polycarbonat oder Polyolefin-Kunststoff (Topas) besteht.

5. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei Steuerung und Regelung von Temperaturen in der Apparatur durch ASICs vorgenommen wird.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

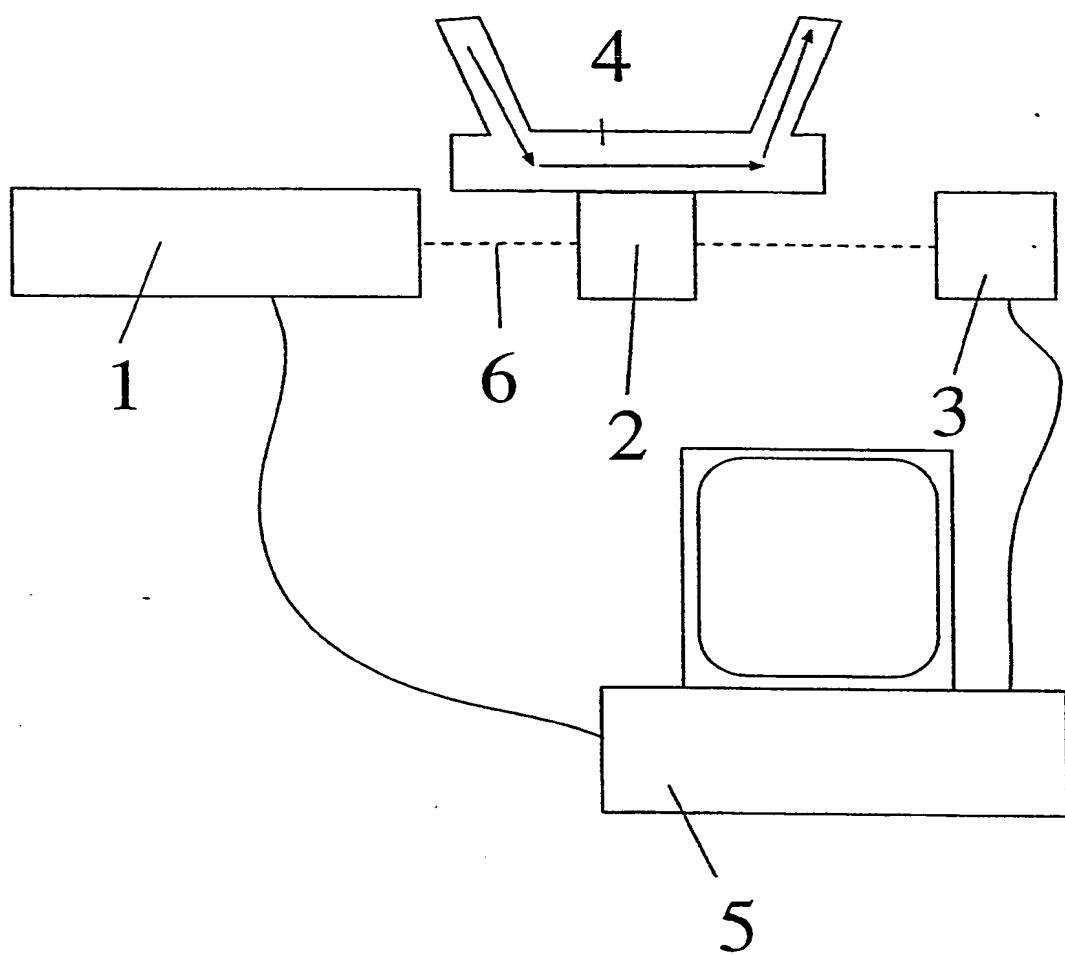


Fig. 2

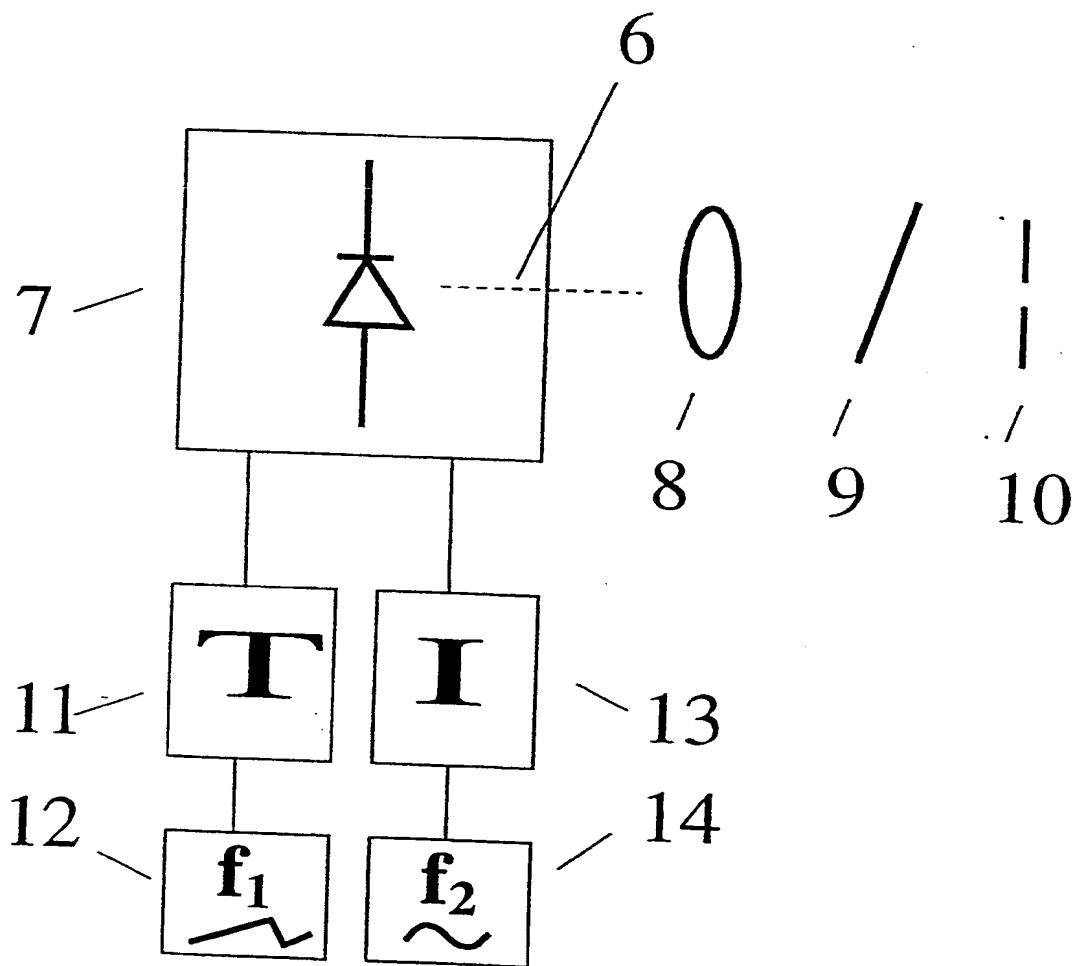


Fig. 3

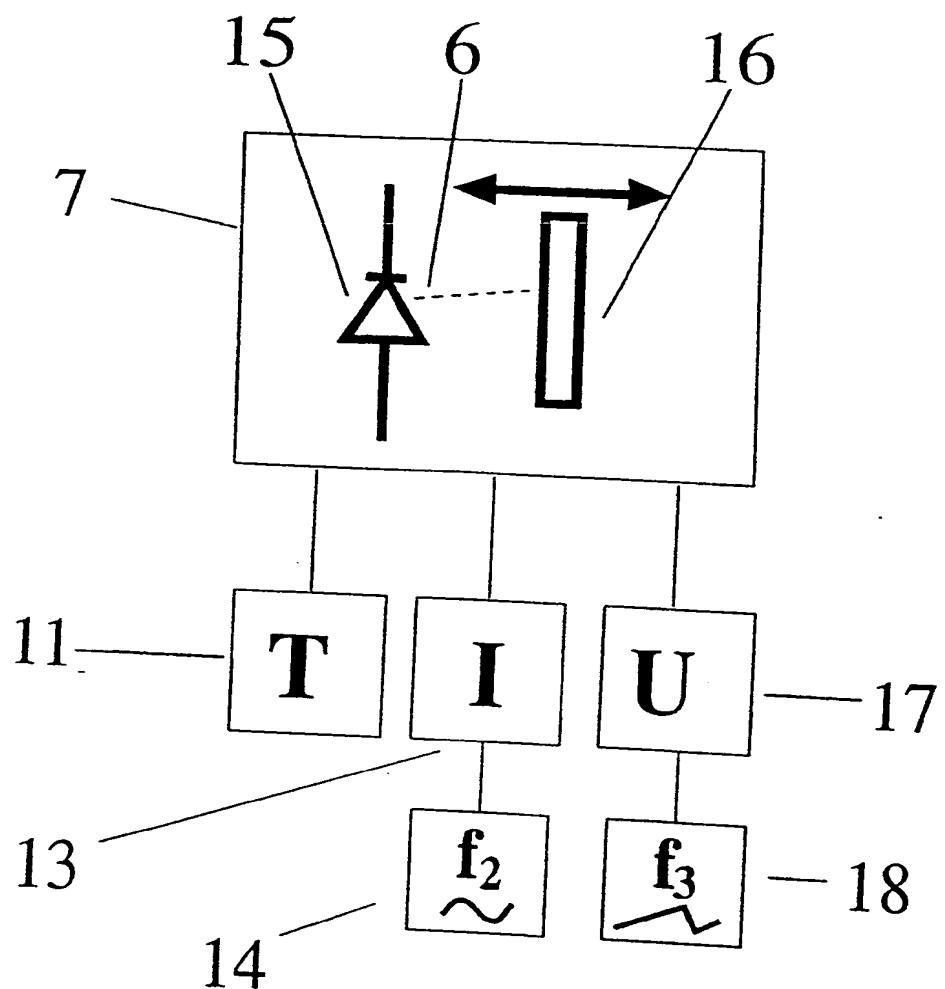


Fig. 4

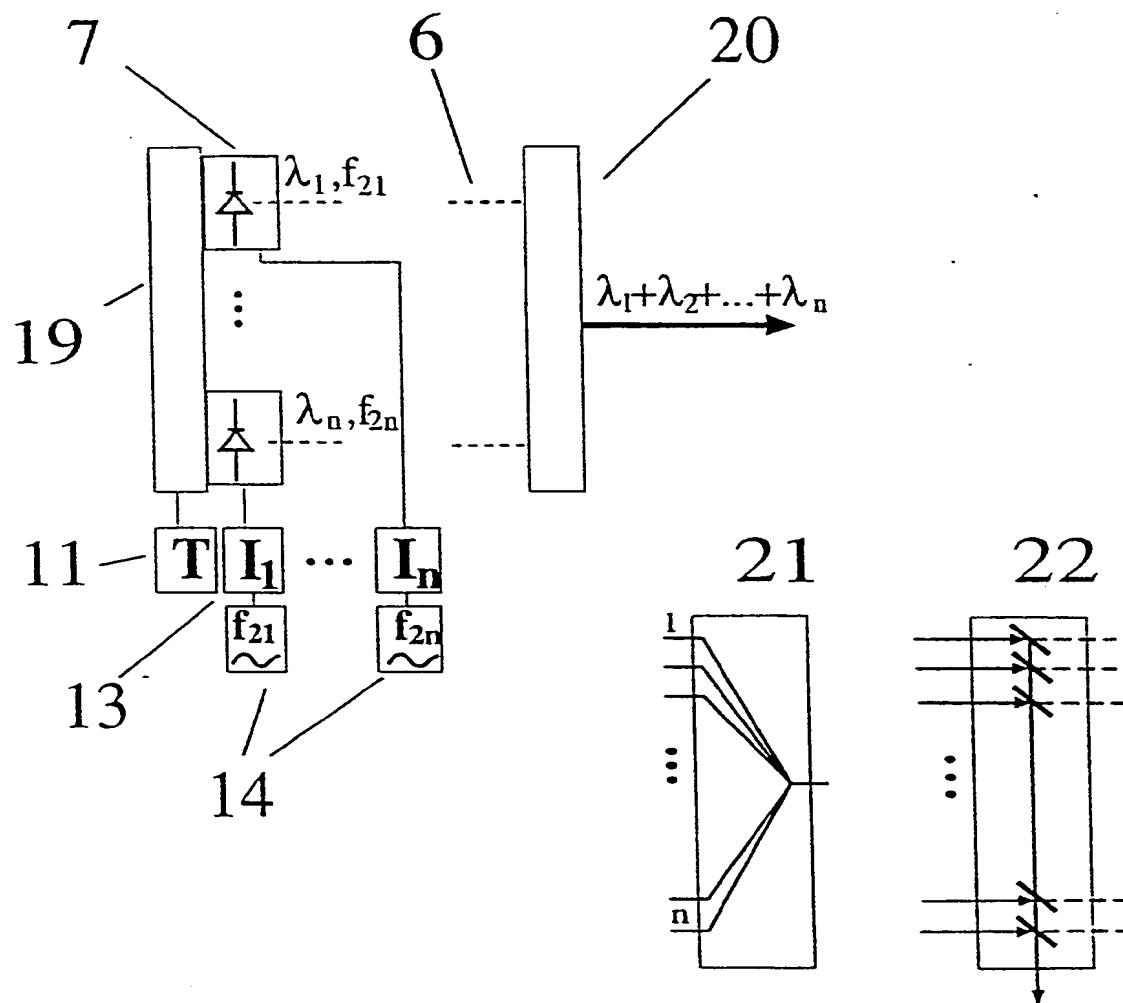


Fig. 5

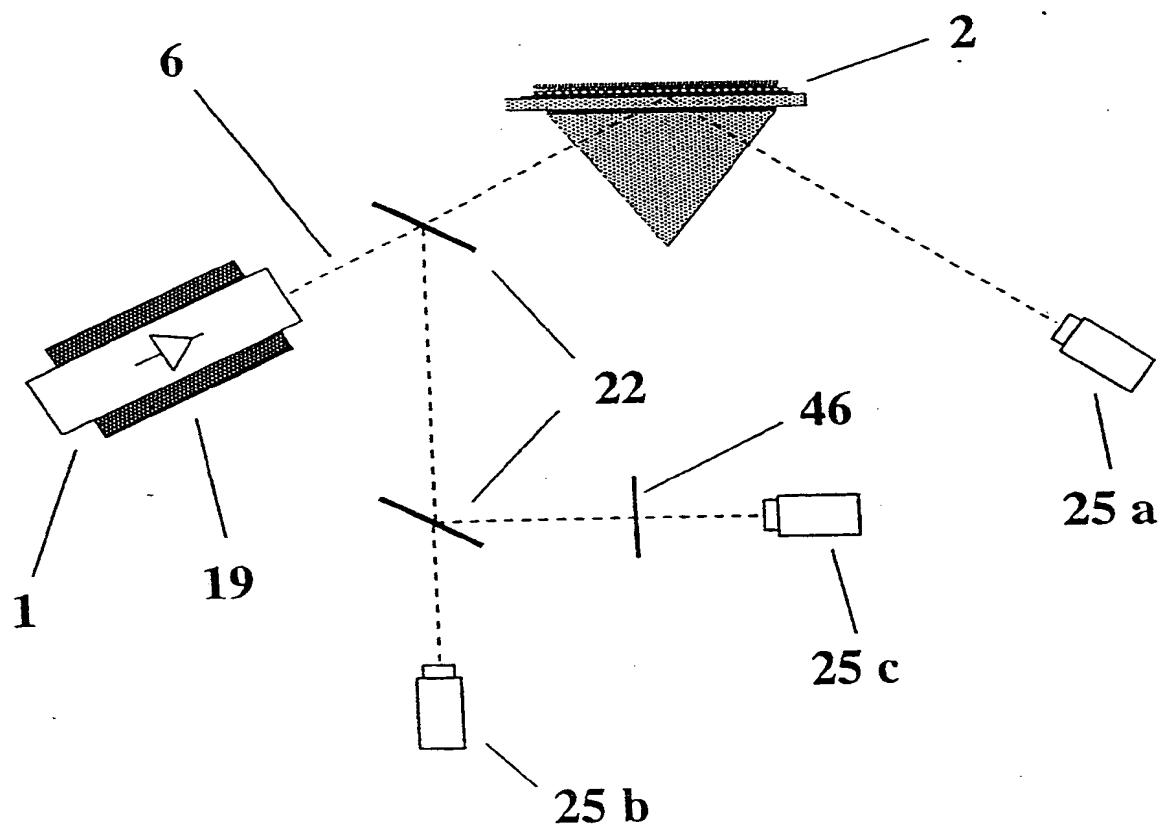


Fig. 6

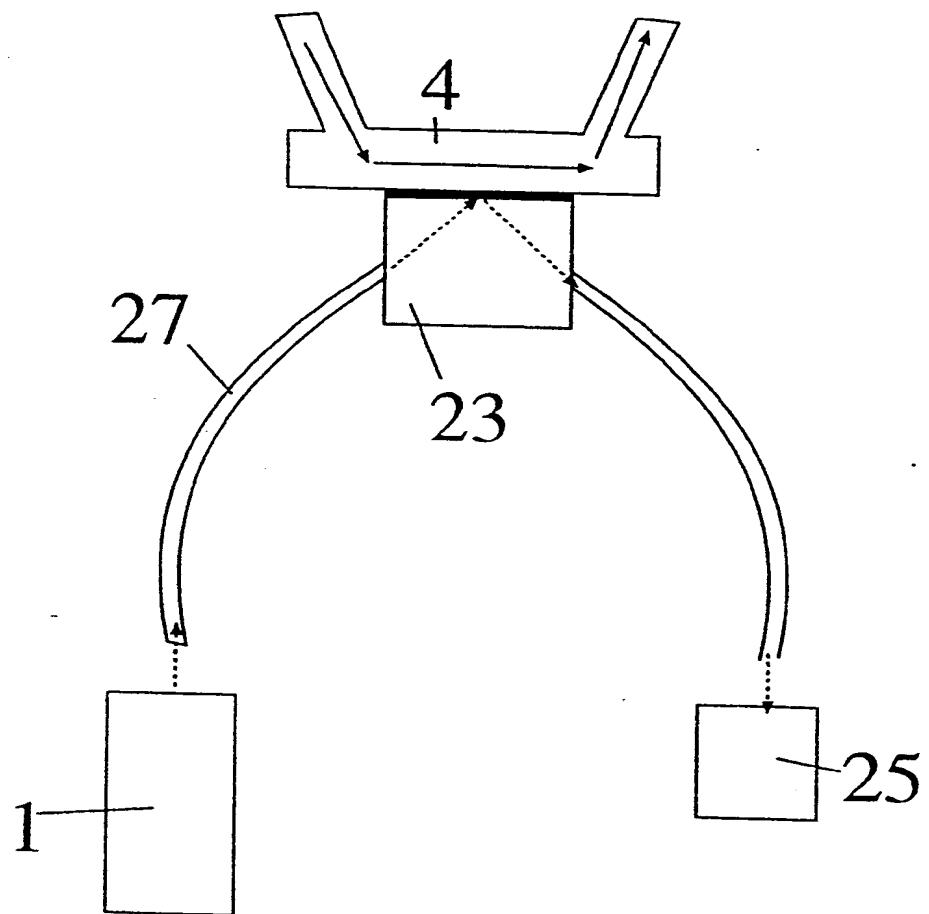


Fig. 7

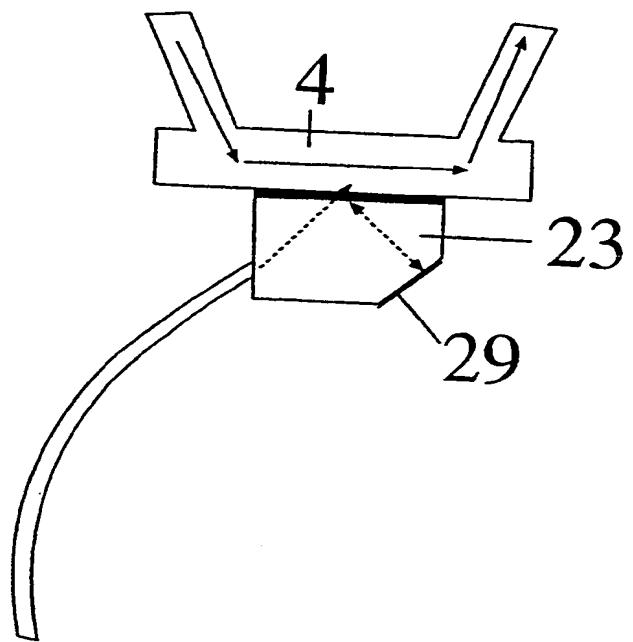


Fig. 8

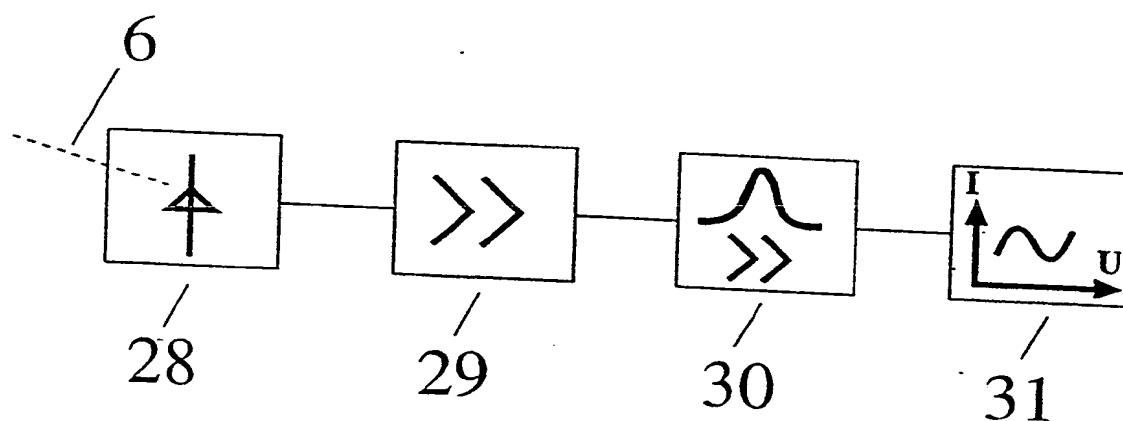


Fig. 9

